

DISS. ETH NO. 17577

The Role of Transmembrane Nucleoporins in Nuclear Pore Complex Biogenesis

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by

JÖRG MANSFELD

Dipl. Biol.

(University of Konstanz)

born 13.09.1976

Bremen, Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Ulrike Kutay, examiner

Prof. Monica Gotta, co-examiner

Prof. Urs Greber, co-examiner

Prof. Jan Ellenberg, co-examiner

2008

Summary

Nuclear pore complexes (NPCs) are the exclusive gateways for directed and selective nucleocytoplasmic transport of proteins and RNAs across the nuclear envelope (NE). NPCs are composed of approx. 30 different proteins, termed nucleoporins, which are assembled in a modular fashion to form whole NPCs. In vertebrates, NPC assembly occurs both after mitosis, when the NE reforms, and during interphase, when NPCs have to be inserted into the closed NE. It is not known to date whether NPC assembly during mitosis and interphase relies on the same mechanism. However, it is assumed that transmembrane nucleoporins, which can anchor the NPC to the NE are required for both processes. Since the general NPC architecture is strikingly conserved during evolution, it is very likely that the mechanism of NPC insertion into the NE is very similar in mammalian cells and yeast. It is therefore surprising that vertebrates and yeast are equipped with completely different sets of transmembrane nucleoporins.

In this study, we identify and characterize human NDC1 as a novel third transmembrane nucleoporin in vertebrates, which is the ortholog of the essential yeast integral membrane nucleoporin Ndc1p. Depletion of NDC1, either in cultured somatic cells or in a nuclear assembly system *in vitro* demonstrates that NDC1 is required for NPC assembly and NE formation. In a comprehensive series of RNAi-mediated knockdown experiments, we further confirm the important role of POM121 for postmitotic NPC assembly. Interestingly, simultaneous depletion of NDC1 and GP210 led to a synergistic loss of NPCs suggesting an overlapping function of both proteins. Because there is no evidence that GP210 plays a role in postmitotic assembly, we speculate that NDC1 and GP210 might function together during interphase NPC assembly. In order to test this hypothesis, we have developed a live microscopy-based assay to monitor *de novo* assembled NPCs during interphase, which can also be applied to subsequent RNAi-based screening approaches in the future.

Transmembrane nucleoporins are thought to recruit soluble nucleoporins to assembly sites during NPC insertion and to anchor the soluble framework of mature NPCs to the NE. Indeed, we show that NDC1 contributes to NUP93 anchorage at the NE by direct binding to NUP53. In addition, our data suggest that also POM121 is likely to be involved in NE recruitment of NUP93 by virtue of interaction with NUP155. These data provide initial insights into how the central framework of the NPC is anchored to the NE via transmembrane nucleoporins.

During nuclear envelope breakdown (NEBD), NPCs are disassembled. The exact molecular mechanisms underlying NEBD and NPC disassembly are still elusive, but it is well accepted that phosphorylation of NE components, including nucleoporins, by mitotic kinases plays an important role in the nuclear disassembly process. Here, we present first evidence that the phosphorylation of NUP53 might destabilize its interactions with NUP155 and NUP205 and, thereby, facilitate NPC disassembly. Whether

also the interactions of NDC1 and POM121 with the NUP93 subcomplex are sensitive to phosphorylation awaits further investigation.

Zusammenfassung

Die Kernporen des Zellkerns sind für gerichteten und selektiven Austausch von Proteinen und RNA-Molekülen zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma verantwortlich. Kernporen sind aus ca. 30 verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen, aufgebaut. Einzelne Nukleoporine interagieren miteinander und bilden so Subkomplexe, die im weiteren zu kompletten Kernporen zusammengesetzt werden.

In Vertebraten werden Kernporen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus neu zusammengebaut. Zum einem direkt nach der Mitose, wenn Kernporen in die neugebildete Kernmembran eingefügt werden, zum anderen während der Interphase, wenn Kernporen in die geschlossene Kernmembran integriert werden müssen.

Das Grundgerüst der Kernporen besteht hauptsächlich aus löslichen Nukleoporinen. Wie genau diese mit der Kernmembran verbunden sind, ist bisher nicht bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass membranständige Nukleoporine eine zentrale Rolle bei der Verankerung von Kernporen in der Kernmembran spielen.

Da die Architektur von Kernporen verschiedener Organismen sehr ähnlich ist, wird angenommen, dass ihr Aufbau auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung zurückgeht. Unter der Annahme, dass Kernporen unterschiedlicher Organismen sehr ähnlich sind, war es daher überraschend, dass die membranständigen Nukleoporine von Vertebraten und Hefen keine Ähnlichkeit aufzeigen.

In dieser Arbeit wird das membranständige Nukleoporin NDC1 als ein neuer Bestandteil der Kernporen von Vertebraten beschrieben. Im Gegensatz zu den bisher bekannten membranständigen Nukleoporinen, ist NDC1 evolutionär von der Hefe bis zu Vertebraten konserviert. Um die Funktion von NDC1 in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde NDC1 mittels RNAi depletiert. Dies führte zum Verlust von Kernporen und lässt auf Fehler während ihres Zusammenbaus schließen. Diese Annahme konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden, die aufzeigten, dass NDC1 für die Bildung von künstlichen Kernen in einem *in vitro* System benötigt wird.

In einer umfassenden Serie von RNAi-Experimenten wurde darüberhinaus die Rolle von NDC1 im Zusammenspiel mit den zwei anderen membranständigen Nucleoporinen der Vertebraten, POM121 und GP210, untersucht. Dazu wurden diese entweder einzeln oder in Kombination mittels RNAi aus Zellen depletiert. Diese Experimente bestätigten, dass POM121, ebenso wie NDC1, eine wichtige Rolle für den Aufbau von Kernporen nach der Zellteilung spielt. Interessanterweise führte der gleichzeitige Verlust von NDC1 und GP210 zu einem synergistischen Verlust von Kernporen, der auf eine sich überschneidende Funktion beider Proteine hinweisen könnte.

Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass GP210 eine Funktion beim Zusammenbau von Kernporen nach der Zellteilung ausübt. Daher könnten NDC1 und GP210 eine gemeinsame Rolle bei der Insertion von Kernporen in die Zellkernmembran während der Interphase haben. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine neue mikroskopische Methode entwickelt, die es erlaubt, den Zusammenbau von Kernporen während der Interphase in lebenden Zellen zu studieren. In Zukunft wird angestrebt, diese Methode in systematischen Studien anzuwenden, in denen die Funktion von weiteren Proteinen während der Insertion von Kernporen in die Kernmembran mittels RNAi analysiert werden soll.

Es wird angenommen, dass membranständige Nukleoporine dafür verantwortlich sind, dass lösliche Nukleoporine an der Kernmembran verankert werden. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass NDC1 an den löslichen NUP93-Subkomplex der Kernpore bindet. Darüberhinaus wurden Hinweise gefunden, dass wahrscheinlich auch POM121 an den NUP93-Subkomplex bindet und somit zur Verankerung der Kernporen an der Kernmembran beiträgt.

Beim Eintritt in die Zellteilung brechen sowohl die Kernmembran als auch die Kernporen zusammen. Wie dieser Vorgang auf molekularer Ebene funktioniert ist noch unbekannt. Es wird allgemein vermutet, dass die Phosphorylierung von Zellkernkomponenten eine wichtige Rolle spielt, indem sie Protein-Protein Interaktionen, z.B. in der Kernpore, aufhebt. Wie konnten anhand von Bindungsexperimenten zeigen, dass eine phosphorylierte Form des Nukleoporins NUP53 nicht mehr an seine Partner im NUP93-Subkomplex, NUP155 und NUP205, binden kann.

Zusammenfassend eröffnet diese Arbeit eine neue und tiefere Einsicht in den Zusammenbau von Kernporen und stellt dar, wie lösliche Nukleoporine an der Kernmembran verankert sind. Desweiteren wird am Beispiel des NUP93-Subkomplexes aufgezeigt, wie Phosphorylierung die Interaktionen zwischen Nukleoporinen aufheben könnte, um zum Zusammenbruch der Kernmembran beizutragen.